

534,715

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2004年5月27日 (27.05.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/043503 A1

- (51)国際特許分類<sup>7</sup>: A61L 15/44,  
15/64, A61K 38/43, 47/48, A61P 7/04
- (21)国際出願番号: PCT/JP2003/014348
- (22)国際出願日: 2003年11月12日 (12.11.2003)
- (25)国際出願の言語: 日本語
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:  
特願2002-330677  
2002年11月14日 (14.11.2002) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 財團法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 Kumamoto (JP).
- (72)発明者; および
- (75)発明者/出願人(米国についてのみ): 内田 隆徳 (UCHIDA,Takanori) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 財團法人化学及血清療法研究所内 Kumamoto (JP). 新屋 希子 (SHINYA,Noriko) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 財團法人化学及血清療法研究所内 Kumamoto (JP). 嘉悦 洋 (KAETSU,Hiroshi) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 財團法人化学及血清療法研究所内 Kumamoto (JP). 今村 隆幸 (IMAMURA,Takayuki) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖1314-1 財團法人化学及血清療法研究所内 Kumamoto (JP).
- (81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84)指定国(広域): ARIPO特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: THROMBIN-CARRYING BIOABSORBABLE SYNTHETIC NONWOVEN FABRIC

(54)発明の名称: トロンбин固定化生体吸収性合成不織布

(57) Abstract: The invention aims at providing a safe and efficacious hemostatic and relates to a bioabsorbable synthetic nonwoven fabric characterized in that thrombin as the active ingredient is fixed to thereto and a hemostatic consisting of the same. The thrombin-carrying bioabsorbable synthetic nonwoven fabric of the invention can be produced by the step of dipping a bioabsorbable synthetic nonwoven fabric in a solution containing thrombin and the step of freeze-drying the resulting nonwoven fabric, and speedy and sure stanching can be attained by using the thrombin-carrying bioabsorbable synthetic nonwoven fabric.

(57)要約: 安全かつ効果的な止血剤を提供する。有効成分としてトロンбинを固定化することを特徴とする生体吸収性合成不織布、及び当該生体吸収性合成不織布からなる止血剤に関する。当該トロンбин固定化生体吸収性不織布は、生体吸収性合成不織布をトロンбинを含む溶液に浸漬する工程、及び該工程で得られた不織布を凍結乾燥する工程を含む工程により製造することができる。本発明のトロンбин固定化生体吸収性合成不織布を用いると、迅速かつ確実な止血が可能となる。

WO 2004/043503 A1

## 明細書

## トロンビン固定化生体吸収性合成不織布

## 技術分野

本発明は有効成分としてトロンビンが固定化されたことを特徴とする生体吸収性合成不織布、その製造方法及び当該不織布からなる止血剤に関する。

## 背景技術

医療分野において止血管理は極めて重要な分野である。生体の血管が損傷を受けた場合、その局所では種々の凝固因子が活性化され最終的にフィブリンが形成されて止血に至る。その際、重要な酵素としてトロンビンが存在し、トロンビンがフィブリノーゲンに作用しフィブリンへ変換される。フィブリノーゲンは血液中に存在するが、そのままでは止血効果はなく、トロンビンの作用によってはじめて止血効果を発揮する。つまり、トロンビンが生体の止血反応の重要な役割を果たしている。

## 発明の開示

## 15 (発明が解決しようとする技術的課題)

従来のトロンビン製剤は液状あるいは粉末であるが、出血局所で流されてしまいトロンビンの止血効果が十分発揮されていないことが多い。それを克服する目的で、生体吸収性材料にトロンビンを固定化したシートに関する種々の報告がある（例えば、国際公開第90/13320号パンフレット及び特公昭61-59737号公報）。ゼラチン製のシート素材に血液由來のトロンビンを固定化したものもその一例であるが、後述の実施例で示されるように十分な止血効果は認められず、かつ製造の困難性や実際の使用上の問題等から、実用化に至った例はほとんどない。また、牛ゼラチンに牛トロンビンを混合したゲルタイプの止血剤があるがBSEなどの危険性や圧迫性の面で問題が残る。

25 また、トロンビンとその他の凝固因子を組み合わせたフィブリン接着剤もある。フィブリン接着剤は、トロンビンとフィブリノーゲンを主成分としており、フィブリノーゲンがトロンビンによりフィブリンに変換されることを利用した生体組織接着剤で、接着、止血、閉鎖を目的とし広く臨床の場で使用されている。しかしながら、術場においてトロンビン液、フィブリノーゲン液などをそれぞれ溶解

して調製する手間がかかるため、緊急時には非常に不便である。

そのような不便性を考慮して、出血部位に直接的にシートで圧迫するタイプのフィブリン接着剤も実用化されている。しかしながら、現行のシートタイプの接着剤の構成成分は、基材が馬コラーゲンであり、かつトロンビンは牛由来であり、  
5 ヒト以外の動物成分が使用されているため、異種タンパクに対する抗体の出現やプリオントン病等の人畜共通感染症の危険性が存在するため理想的なものとはいえない。つまり、現状の局所止血剤は使用性や安全性の面で十分とはいえない。

これらの問題を解決するには、ヒトと同じ成分で感染因子の存在しない凝固因子から成り、さらに止血効果を十分に発揮するために厳選工夫された素材による  
10 シートタイプで、しかもその材質も生体に安全であることが求められる。

#### (その解決方法)

そこで、本発明者らは上記の諸問題に鑑み、鋭意検討した結果、局所止血剤に関する本発明を完成した。すなわち、本発明は、生体吸収性材料の中でも特に不織布に加工された生体吸収性合成不織布に、止血の有効成分であるトロンビンが固定化された生体吸収性合成不織布、その製造方法及び当該不織布からなる止血剤に関する。  
15

#### (従来技術より有効な効果)

本発明によるトロンビン固定化生体吸収性合成不織布は以下のようない性質を有しており、理想的な局所止血剤である。

- 20 · 止血効果が優れている。
- 緊急時の取り扱いが容易である。
- 安全性に優れている。
- 経時的に吸収される。
- 伸縮性・柔軟性に優れている。
- 25 · 広範囲に亘る止血も可能となる。
- 炎症反応が軽微であるかまたは全く惹起しない。

したがって、本発明は、外科手術のさまざまな分野で組織の閉鎖を必要とする手術において、安全に止血を行うことのできる生体吸収性合成不織布からなる止血剤を提供するものである。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明に使用される生体吸収性合成不織布は、生体吸収性の合成纖維からなる不織布であれば、特に限定されるものではない。また、本発明の不織布は、いかなる患部にも確実に被覆可能なように適度な柔軟さを有することが好ましい。例  
5 えば、そのような不織布を形成しうる合成纖維として、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、またはグリコール酸及び乳酸の共重合体などを不織布に加工したものが使用可能である。中でも、ポリグリコール酸を不織布に加工した生体吸収性合成不織布は、本発明の目的に極めて好ましい素材である。

当該不織布の形状としては特に限定されるものではないが、種々の用途への適用しやすさの観点からシート状であることは好ましい形状の一つである。  
10

トロンビンとしては、ヒト血液由来のトロンビン、または遺伝子組換え技術により得られる組換えヒトトロンビンのいずれも使用可能である。また、当該トロンビンに加え、薬学的に許容しうる安定剤及び添加剤を添加してもよい。そのよう  
15 安定剤及び添加剤の例として、例えば、アルブミン、ポリエチレングリコール、アルギニン、ヒアルロン酸ナトリウム、グリセリン、マンニトール及び塩化カルシウムなどがある。

本発明のトロンビン固定化生体吸収性合成不織布は、例えば下記のようにして製造することができる。

トロンビンを生理食塩水または緩衝液に溶かし、さらに選択的にそのトロンビン溶液に安定化剤や添加剤として、アルブミン、ポリエチレングリコール、アルギニン、ヒアルロン酸、グリセリン、マンニトールや塩化カルシウム等を適宜加える。当該溶液に生体吸収性合成不織布を浸漬し、-80°C、2時間凍結後、乾燥することにより得られる。  
20

出血局所を本発明のトロンビン固定化生体吸収性不織布で圧迫すると、圧迫効果により血液の流出を防ぎ、さらにシート中のトロンビンが血液中のフィブリノーゲンと即座に反応しフィブリンに変換することにより、局所での止血効果が発揮される。また、形成されたフィブリンは周辺組織と接着する。  
25

ポリグリコール酸を材料とする生体吸収性不織布は既に医療用として使用されており、生体に吸収され水と二酸化炭素に分解されることから、安全性も実証さ

れている。

### 産業上の利用の可能性

このように本発明のトロンビン固定化生体吸収性不織布は、局所出血に簡便かつ早急に対処が可能であり、圧迫止血と血液凝固反応により効果的な止血を可能とする。しかも、いずれの成分も生体に安全なものを用いているため医療現場で安心して利用できる。

以下、本発明の実施例を示し本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 《実施例1：組換えトロンビンの調製》

組換えトロンビンは特願2001-206919に準じて調製された。簡潔に記載すると、ヒトプレトロンビン遺伝子を導入された動物細胞を培養して、その培養液からプレトロンビンを精製する。一方、エカリン遺伝子を導入された動物細胞の培養液からエカリンを精製して、そのエカリンにより、プレトロンビンを活性化して、トロンビンを精製することができる。

#### 《実施例2：トロンビン固定化シートの作製》

本発明のトロンビン固定化シートの作製は以下の方法に従って行った。

0.001～0.01%ヒアルロン酸ナトリウム（ナカライ化学：18237-41）または0.5～2%グリセリン（ナカライ化学：170-18）を含む溶液に、マニニトール（ナカライ化学：213-03）を最終濃度0.5～1.5%、塩化カルシウムを40mM加え、組換えトロンビンを最終濃度1000U/mLの濃度で添加する。この溶液をポリグリコール酸からなる生体吸収性合成不織布3cm×3cm（製品名：ネオベール／グンゼ（株），厚さ：0.15mm）に1cm<sup>2</sup>当たり0.05mLを滴下する。このシートを-80°Cで2時間凍結後、乾燥させたものを組換えトロンビン固定化シートのサンプルとする。また、組換えトロンビンの代わりにヒト血液由來のトロンビンを用いて、同様に血液由來トロンビン固定化シートを作製する。

対照のシートとして、トロンビン処理なしの生体吸収性合成不織布、国際公開第90/13320号パンフレットの実施例の記載に従って作製したゼラチン製止血スポンジ、また、市販のシート状フィブリン接着剤を使用した。

＜第1群：血液由來トロンビン固定化シート＞

ポリグリコール酸製不織布にヒト血液由来トロンビン50U/cm<sup>2</sup>を固定化したシートを用いた。

<第2群：組換えトロンビン固定化シート>

ポリグリコール酸製不織布に組換えトロンビン50U/cm<sup>2</sup>を固定化したシートを用いた。

<第3群：トロンビン非固定化シート>

ポリグリコール酸製不織布をトロンビンを含まない条件で第1群と同様に処理したシートを用いた。

<第4群：トロンビン固定化止血スポンジ>

国際公開第90/13320号パンフレットの実施例に記載された方法に従つて調製したトロンビン（ヒト血液由来）を含むゼラチン製止血スポンジ（製品名：スponゴスタン／ジョンソン＆ジョンソン社）を用いた。

<第5群：シート状フィブリン接着剤>

コラーゲンシートにフィブリン糊が固定化されたシート状フィブリン接着剤（製品名：タココンプ／鳥居薬品（株）：フィブリノーゲン及びトロンビン等の成分をスポンジ状のウマコラーゲンのシートを支持体とし、シートの片面に真空乾燥により固着されたもの）を用いた。

《実施例3：滲出性出血に対する止血試験》

動物の止血モデルとしてはウサギを用いた。ウサギを開腹し、肝臓の一部を切除して、その出血部位に、実施例2で作製した各群の止血剤を創面全体にあて、1分間圧迫した。具体的な評価方法を以下に示す。

①ネンプタール麻酔下でウサギを開腹。

②ヘパリンを300U/kg静脈内投与。

③肝臓の右葉、内側左葉または外側左葉表面を、直径1.5cmの円形に4mmの厚さに切除。

④切除創からの出血を10秒間ガーゼに吸収して重量を測定。切除創作成後の出血量は、約0.50gであった。

⑤上述の各種方法で止血を試みた。それぞれの処置は駆血をせず血液が流出した状態で行った。

⑥それぞれの止血処置時間を含め5分間の出血をガーゼに吸収して重量を測定した。5分間経った時点で創面からの出血がみられた場合には、それぞれの止血処置と出血量の測定を繰り返し行った。

⑦止血処置は最大4回まで実施し、止血までに要した止血処置の回数と、止血処置開始から止血までの出血の総重量で評価した（表1）。

5

表1

群	各止血処置回数で止血できた数				止血処置後の総出血量／g
	1回目	2回目	3回目	4回目	
第1群	7	1	0	0	0.51±0.31
第2群	7	1	0	0	0.34±0.15
第3群	2	3	3	0	2.03±0.95
第4群	0	2	4	2*	6.28±1.67
第5群	0	4	1	3*	6.70±2.64

\*：4回目の止血処置後も止血不可能例があった。

表1に示されるように、本発明のトロンビン固定化シートは、血液由来トロンビン（第1群）および組換えトロンビン（第2群）のいずれを使用した場合も、対照のシートと比較して、優れた止血効果が認められた。トロンビン処理をしていない不織布（第3群）だけでは殆ど止血効果は認められなかつたが、国際公開第90/13320号パンフレットに記載されたトロンビン固定化ゼラチン製止血スポンジ（第4群）よりも止血効果は優れていた。この結果は公知の生体吸収性材料の中でも特に本発明において基材として使用された生体吸収性不織布が止血目的に好適な材料であることを示すものである。さらにこの不織布にトロンビンが固定化された止血剤により迅速かつ確実な止血が可能となることが明らかになった。さらに、コラーゲンを基材とするシート状フィブリン接着剤（第5群）も、本比較試験の結果、本発明のトロンビン固定化シートと比べて、はるかに止血効果は劣った。

10

15

## 請求の範囲

1. 有効成分としてトロンビンが固定化されることを特徴とする生体吸収性合成不織布。
2. 当該生体吸収性合成不織布の材料が、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコール酸と乳酸との共重合体からなる群より選択される請求項1記載の生体吸収性合成不織布。  
5
3. 当該生体吸収性合成不織布の材料がポリグリコール酸である請求項2に記載の生体吸収性合成不織布。
4. トロンビンがヒト血液由来トロンビンまたは遺伝子組換え技術により生産される組換えヒトトロンビンである請求項1ないし3のいずれかに記載の生体吸収性合成不織布。  
10
5. 請求項1から4のいずれかに記載の生体吸収性合成不織布を用いる止血剤。
6. 生体吸収性合成不織布をトロンビンを含む溶液に浸漬する工程、及び該工程で得られた不織布を凍結乾燥する工程を含むトロンビン固定化生体吸収性合成不  
15織布の製造方法。
7. 当該生体吸収性合成不織布の材料が、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコール酸と乳酸との共重合体からなる群より選択される請求項6記載の製造方法。
8. 当該生体吸収性合成不織布の材料がポリグリコール酸である請求項7に記載の製造方法。  
20
9. トロンビンがヒト血液由来トロンビンまたは遺伝子組換え技術により生産される組換えヒトトロンビンである請求項6ないし8のいずれかに記載の製造方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14348

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' A61L15/44, 15/64, A61K38/43, 47/48, A61P7/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' A61L15/44, 15/64, A61K38/43, 47/48, A61P7/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 58-44057 A (Unitika Ltd.), 14 March, 1983 (14.03.83), Claim 1; page 2, upper right column, line 12; page 2, lower left column, line 13 (Family: none)	1-9
X	JP 54-104687 A (Unitika Ltd.), 17 August, 1979 (17.08.79), Claim 1; page 1, lower right column, line 18 (Family: none)	1-9
X	WO 99/59647 A1 (THE AMERICAN NATIONAL RED CROSS), 25 November, 1999 (25.11.99), Claims 2, 8 & JP 2002-515300 A	1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search  
13 January, 2004 (13.01.04)Date of mailing of the international search report  
27 January, 2004 (27.01.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' A61L15/44, 15/64, A61K38/43, 47/48, A61P7/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' A61L15/44, 15/64, A61K38/43, 47/48, A61P7/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), JICST(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 58-44057 A (ユニチカ株式会社) 1983. 03. 14, 請求項1, 第2頁右上欄第12行, 第2頁左下欄第13行(ファミリーなし)	1-9
X	JP 54-104687 A (ユニチカ株式会社) 1979. 08. 17, 請求項1, 第1頁右下欄第18行(ファミリーなし)	1-9
X	WO 99/59647 A1 (THE AMERICAN NATIONAL RED CROSS) 1999. 11. 25, クレーム2及び8 & JP 2002-515300 A	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

13. 01. 2004

## 国際調査報告の発送日

27. 1. 2004

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

田名部 拓也

4P 9738

電話番号 03-3581-1101 内線 3492